

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/035853 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 5/06,
5/10, C12Q 1/02

du Général de Gaulle, F-94704 Maisons Alfort (FR).
AROCK, Michel [FR/FR]; 113, rue du Château, F-75014
Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/03616

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie José** etc.;
Cabinet Ores, 36, rue de St. Pétersbourg, F-75008 Paris
(FR).

(22) Date de dépôt international :
22 octobre 2002 (22.10.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/13608 22 octobre 2001 (22.10.2001) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*)
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Uni-
versité, F-75007 Paris (FR). ECOLE NATIONALE
VETERINAIRE DE MAISONS ALFORT (ENVA)
[FR/FR]; 7, avenue du General de Gaulle, F-94704
Maisons Alfort (FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **FEME-
NIA, Françoise** [FR/FR]; 36, avenue du Bois Guimier,
F-94100 Saint-Maur-Des-Fosses (FR). **DELOUIS,
Claude** [FR/FR]; 5, Parc de Diane, F-78350 Jouy-en-Josas
(FR). **PARODI, André, Laurent** [FR/FR]; 61, avenue
Albert er, F-94210 Saint-Maur-la-Varenne (FR). **LILIN,
Thomas** [FR/FR]; Ecole Nationale Vétérinaire, 7, avenue

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 03/035853 A1

(54) Title: PIG MAST CELL CULTURES AND USES THEREOF

(54) Titre : CULTURES DE MASTOCYTES DE PORC ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining pure pig mast cell cultures by culturing stem cells derived from the liver and the fetal marrow in the presence of IL-3 and SCF. The invention also concerns pig mast cell lines derived from said cultures.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé d'obtention de cultures pures de mastocytes de porc par mise en culture de cellules souches issues du foie et de la moelle f tale en présence d'IL-3 et de SCF. L'invention concerne également des lignées de mastocytes de porc issues de ces cultures.

CULTURES DE MASTOCYTES DE PORC ET LEURS UTILISATIONS

L'invention est relative à des cultures de mastocytes de porc et à leurs utilisations.

Les mastocytes sont des cellules du système
5 immunitaire, qui interviennent dans la réponse inflammatoire, notamment dans les phénomènes d'allergie et d'hypersensibilité. Elles sont localisées dans le tissu conjonctif, notamment au niveau de la peau, des tractus digestif et respiratoire, et dans les muqueuses intestinales
10 et respiratoires. Il existe également un petit nombre de mastocytes dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes.

Les mastocytes matures, quelle que soit leur localisation, ont en commun certaines caractéristiques telles
15 que la présence de nombreuses granulations intra cytoplasmiques métachromatiques. Il s'agit de cellules arrondies d'un diamètre de 13 à 22 μm ; elles possèdent un noyau arrondi, unique, central ou le plus souvent excentré. Le cytoplasme est entièrement rempli de granulations,
20 l'abondance des granulations recouvrant parfois une partie du noyau.

Ces granulations renferment différentes substances chimiques synthétisées par les mastocytes, parmi lesquelles on citera notamment l'histamine, la sérotonine,
25 des protéoglycannes tels que l'héparine ou le chondroïtine sulfate, des enzymes, notamment des protéases, des cytokines telles que le TNF-alpha, et des facteurs "chimioattractants" des éosinophiles et des neutrophiles (ABRAHAM et MALAVIYA, Infection and Immunity, 65, 3501, 1997). Ces substances pro-
30 inflammatoires sont libérées brutalement (phénomène dénommé « dégranulation ») lors de l'activation mastocytaire. Dans un deuxième temps se met en place une réponse secondaire, liée à la synthèse de novo de médiateurs tels que les leucotriènes, prostaglandines, PAF (*platelet activating factor*), mais aussi
35 d'interleukines (IL4, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13), de cytokines (TGF-beta, IFN-gamma, GM-CSF) et de chimiokines (MCP-1, IL8, RANTES) (BEFUS, Reg. Immunol., 2, 176, 1989 ;

MOQBEL et al., Immunology, 60, 425, 1987). L'ensemble de ces facteurs participe activement à l'enclenchement d'un processus inflammatoire et à la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique dépendante des lymphocytes T.

5 Les mastocytes constituent en fait une population cellulaire très hétérogène.

Deux sous-populations mastocytaires distinctes qui présentent des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles très différentes ont été caractérisées : les
10 mastocytes muqueux et les mastocytes séreux. Ces deux sous-populations peuvent être différenciées par les substances actives élaborées et stockées dans les granules. Ainsi, chez la souris les mastocytes muqueux produisent principalement de l'histamine, de la chymase et du chondroïtine sulfate A et E,
15 et les mastocytes séreux produisent principalement de l'histamine, de la sérotonine, de la chymase, de la tryptase et de l'héparine.

Chez l'homme les mastocytes muqueux également dénommés MC_T (tryptase +) produisent principalement de
20 l'histamine, de la tryptase, de l'héparine, et du chondroïtine sulfate A et E, et les mastocytes séreux également dénommés MC_{TC} (tryptase + et chymase +) produisent en outre de la chymase.

Les mastocytes sont dérivés de précurseurs
25 hématopoïétiques (GALLI, Lab. Invest. 62, 5-33, 1990). Des populations de mastocytes ont été obtenues à partir de cultures de moelle osseuse de souris (RAZIN et al., J. Biol. Chem., 257, 7229-7236, 1982 ; DAYTON et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 569-572, 1988) en présence de milieux
30 conditionnés ou en présence d'IL3. A partir d'une suspension de cellules hématopoïétiques de souris, on obtient une population pure de mastocytes en 3 semaines.

L'obtention de cultures *in vitro* de mastocytes humains s'est avérée plus difficile. Des cultures de cellules
35 de moelle osseuse ou de cordon ombilical en présence d'IL3 ont conduit à l'apparition de granulocytes basophiles (TADOKORO et al., J. Exp. Med., 158, 857-871, 1983). La

co-culture de cellules de cordon ombilical humain avec des fibroblastes 3T3 de souris a toutefois permis d'obtenir des mastocytes matures après quatre semaines de culture (ISHIZAKA et al., Current Opinion in Immunology, 5, 937-943, 1993 ;
5 FURITSU et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 10039-10043, 1989). Il a ensuite été montré (ISHIZAKA et al., publication précitée) que la différenciation et la prolifération des mastocytes humains *in vitro* dépend du ligand c-kit (également dénommé SCF pour : « Stem Cells Factor ») produit par les
10 cellules 3T3.

Les cultures de mastocytes constituent un outil utile pour l'étude des mécanismes impliqués dans différents phénomènes inflammatoires et/ou immunitaires, par exemple dans le cadre de la réponse allergique, ou de la réponse
15 immunitaire à l'agression par divers pathogènes, notamment des parasites. Cependant on n'a jusqu'à présent réussi à différencier et maintenir *in vitro* des cultures de mastocytes que dans le cas des cellules humaines ou de rongeurs ; en outre on ne dispose actuellement que d'un petit nombre de
20 lignées de mastocytes.

La présente invention a pour but de fournir des cultures de mastocytes provenant du porc, et des lignées de mastocytes issues de ces cultures. En effet, outre son intérêt économique, le porc constitue un modèle de plus en
25 plus utilisé dans le cadre d'études physiologiques et cliniques. D'autre part, le porc héberge des parasites transmissibles à l'homme (Trichinella, cysticerques, toxoplasme), et l'étude du rôle joué par les mastocytes dans les mécanismes de défense vis-à-vis de ceux-ci, présente un
30 grand intérêt du point de vue de la santé animale et de la santé publique (prophylaxie médicale).

Des études précédentes ont montré que l'établissement de lignées de mastocytes humains et de rongeurs uniquement isolées à partir de tumeurs
35 (mastocytomes) nécessitait la présence d'une seule cytokine spécifique dans le milieu de culture.

La présence de mastocytomes de porc est une éventualité extrêmement rare, ce qui a interdit à ce jour, l'obtention de lignées de mastocytes de cette espèce.

Les Inventeurs sont maintenant parvenus à mettre
5 au point une méthode de culture, en présence de 2 cytokines spécifiques, permettant l'obtention, à partir de précurseurs hématopoïétiques du foie ou de la moelle osseuse, d'une population pure de mastocytes porcins, et son maintien en culture pendant une très longue durée.

10 Ils sont en outre parvenus à obtenir, à partir de cette culture, des cellules immortalisées, conservant les caractéristiques des mastocytes d'origine.

La présente invention a en conséquence pour objet un procédé d'obtention d'une culture de mastocytes porcins
15 caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture de cellules souches obtenues à partir du foie ou de la moelle osseuse d'un fœtus de porc, dans un milieu comprenant au moins 0,2 ng/ml, avantageusement de 0,5 à 10 ng/ml, de préférence de 1 à 5 ng/ml, et de manière tout à fait préférée
20 environ 2 ng/ml d'IL-3 porcin, et au moins 8 ng/ml, avantageusement de 20 à 200 ng/ml, de préférence de 40 à 120 ng/ml, et de manière tout à fait préférée environ 80 ng/ml de SCF porcin.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la
25 présente invention, les cellules sont cultivées dans ce milieu pendant au moins 60 à 70 jours pour obtenir 100% de mastocytes.

Selon un autre mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit procédé comprend en outre la
30 transformation de ladite culture par un oncogène immortalisant.

La présente invention a également pour objet toute culture de mastocytes porcins susceptible d'être obtenue par le procédé conforme à l'invention.

35 Au moins 90%, de préférence au moins 95%, et de manière tout à fait préférée au moins 99% des cellules de cette culture présentent les caractéristiques suivantes :

- elles renferment des granulations contenant de l'histamine et de l'héparine ;

- elles expriment le récepteur c-kit et le récepteur des IgE.

5 La présente invention englobe notamment toute sous-population, lignée, ou clone de mastocytes pouvant être obtenu à partir des cultures de mastocytes porcins conformes à l'invention.

10 Le terme « culture » désigne ici, de manière générale, une cellule ou un ensemble de cellules cultivées *in vitro*. Une culture développée directement à partir d'un prélèvement cellulaire ou tissulaire effectué sur un animal est dénommée « culture primaire ». Le terme « lignée » est employé à partir du moment où au moins un passage, et
15 généralement plusieurs passages consécutifs en sous-culture ont été effectués avec succès, et désigne toute culture qui en est issue. Le terme « clone » désigne un ensemble de cellules issues d'une seule cellule d'une culture primaire ou d'une lignée (SCHAEFFER, *In Vitro Cellular and Developmental*
20 *Biology*, 26, 91-101, 1990).

La présente invention a ainsi plus particulièrement pour objet :

- une lignée de mastocytes issus de cellules souches du foie fœtal de porc, déposée auprès de la CNCM
25 (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 26 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, France) le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2735.

- une lignée de mastocytes issus de cellules souches du foie fœtal de porc et transfectés par l'oncogène T
30 du virus SV40, déposée auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2736.

- une lignée de mastocytes issus de cellules souches de la moelle osseuse d'un fœtus de porc et transfectés par l'oncogène T du virus SV40, déposée auprès de
35 la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2734.

Toutes ces cellules peuvent être cultivées dans les conditions définies ci-dessus.

Le maintien en culture ne nécessite toutefois pas la présence d'IL-3, et le SCF peut être utilisé à des doses plus faibles que celles utilisées pour l'obtention des cultures. Ainsi on peut utiliser le SCF à des concentrations à partir de 2 ng/ml, de préférence à des concentrations de 5 à 100 ng/ml, avantageusement de 8 à 80 ng/ml. Ces cellules peuvent également être maintenues en culture en l'absence de SCF et d'IL-3 pendant environ 2 mois.

Les mastocytes conformes à l'invention peuvent notamment être utilisés comme modèles pour étudier l'activation mastocytaire en réponse à un allergène, ou à un parasite. Ils présentent un intérêt tout particulier en tant que modèle *in vitro* pour l'étude des mécanismes immunitaires qui sont impliqués dans l'acquisition d'une immunité protectrice vis-à-vis de nématodes parasites. A titre d'exemple, on citera l'étude des mécanismes impliqués dans la mise en place d'une immunité locale après l'infestation des cellules épithéliales intestinales par *Trichinella*.

Les mastocytes conformes à l'invention peuvent également être utilisées pour identifier les antigènes intervenant dans l'activation des mastocytes non seulement chez le porc, mais également chez d'autres animaux, y compris l'homme, en particulier dans le cadre du criblage d'antigènes potentiellement utilisables pour l'obtention de vaccins ou de réactifs de diagnostic. On peut notamment tester ainsi des antigènes recombinants ou synthétiques, sur la base de leur capacité à activer *in vitro* ces mastocytes.

Dans le cas de *Trichinella* par exemple, ces antigènes peuvent avoir des applications pour le diagnostic des trichinelloses animales (diagnostic précoce de la trichinellose des suidés), ou pour le développement de vaccins (par exemple vaccination par voie mucosale).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs décrivant l'obtention de cultures et de lignées de mastocytes porcins conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : ISOLEMENT DE POPULATIONS PURES DE MASTOCYTES A PARTIR DE MOELLE OU DE FOIE DE FŒTUS DE PORC

Prélèvement et mise en culture des cellules

Les prélèvements ont été réalisés à partir de
5 7 fœtus d'une truie Meishan au 77^{ème} jour de gestation ;
7 foies et 8 fémurs ont été prélevés.

Récolte des cellules du foie

Les foies ont été broyés et les cellules
individualisées avec 20 ml de trypsine 0,5% EDTA 5 mM, dans
10 un bain marie à 37°C pendant 15 mn. Après incubation, une
filtration sur des gazes stériles a été réalisée en
effectuant plusieurs rinçages avec du milieu DMEM (GIBCO),
supplémenté en SVF à 15%, Pénicilline/Streptomycine 100 U/ml,
Glutamine 2 mM (milieu DMEM complet).

15 Après une centrifugation de 5 mn à 1000 g, un
gradient de ficoll a été utilisé afin d'éliminer les
hématies ; le culot est repris dans 25 ml de milieu DMEM pour
17 ml de ficoll. Une centrifugation a été effectuée à 1500 g
pendant 25 mn, l'anneau de cellules blanches est ensuite
20 prélevé et rincé deux fois en milieu DMEM complet.

Le culot a été ensuite récupéré dans 10 ml de
milieu MEM α (GIBCO) et une numération cellulaire a été
réalisée (soit 2.10^6 cellules/ml).

Les cellules ont étéensemencées, à raison de
25 4.10^6 cellules/ml, dans une flasque avec 5 ml de milieu MEM α
supplémenté en SVF (sérum de veau fœtal) à 15%,
Pénicilline/Streptomycine 100 U/ml, Glutamine 2 mM, PGE2
(prostaglandine E, Sigma) à 1 μ M final (milieu MEM α
complet), en présence d'IL3 (2 ng/ml) et de SCF (80 ng/ml)
30 porcins recombinants (BIOTRANSPLANT).

Récolte des cellules de la moelle osseuse

Les fémurs de fœtus ont été coupés à l'aide de
ciseaux à chaque extrémité et la moelle osseuse a été
récoltée par perfusion à l'aide d'une seringue contenant du
35 PBS.

Une fois rincées en PBS, les cellules ont été ensemencées, à raison de $2,4 \cdot 10^6$ cellules/ml, dans une flasque avec 20 ml de milieu MEM α complet en présence d'IL3 porcin (2 ng/ml) et de SCF porcin (80 ng/ml).

5 Culture des cellules

Les flasques sont placées à l'étuve à 37°C en présence de CO₂ (à 5%).

Les cellules sont réensemencées toutes les semaines à raison de 10^6 cellules/ml, dans du milieu MEM α complet en présence d'IL3 porcin (2 ng/ml) et de SCF porcin (80 ng/ml).

Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers pour effectuer une numération cellulaire. Après cytoçentrifugation et coloration au bleu de toluidine, le pourcentage de mastocytes est obtenu par comptage au microscope.

Les résultats sont rapportés dans le tableau I ci-après.

TABLEAU I				
Age de la Culture en jours	Cellules de moelle osseuse 10^6 /ml	Mastocytes %	Cellules de foie 10^6 /ml	% Mastocytes
5	0,7	0	3	0
12	0,5	rare	0,6	70
19	0,9	5	0,4	80
26	0,4	30	0,4	80
33	0,5	70	0,3	80
40	0,7	80	0,3	80
47	0,3	80	0,4	80
54	0,6	90	0,4	90
60	1,3	100	0,6	90
67	1,7	100	1,1	100
74	1	100	0,8	100
82	1,8	100	1,1	100
89	1	100	0,8	100
90	1	100	0,7	100
97	-	-	1,3	100
104	-	-	0,9	100

La cinétique des cultures, quelle que soit leur provenance tissulaire, révèle qu'après une période de 60 jours (moelle osseuse) et de 67 jours (foie fœtal), la population cellulaire subit un accroissement sensible, notamment pour les cellules d'origine médullaire. Cet

accroissement correspond au passage d'une culture mixte à une population homogène 100% de mastocytes.

Ces cellules demeurent capables de se multiplier après congélation/décongélation.

5 A ce jour, après 714 jours de culture, les mastocytes sont viables et continuent de se multiplier.

Caractérisation des cellules

10 Les mastocytes sont mis en évidence par coloration au bleu de toluidine et coloration de May Grünwald et Giemsa. L'héparine et l'histamine des granulations sont révélées par coloration au sulfate de berbérine et au bleu alcian-safranine.

15 Les mastocytes en culture apparaissent arrondis avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Le noyau est arrondi, le plus souvent central ou excentré non segmenté ; dans le cytoplasme les granulations sont nombreuses, de couleur violet foncé à rouge ; le nombre et la taille des granulations varient : elles sont petites et peu nombreuses dans les cellules considérées comme immatures ; elles sont
20 nombreuses et volumineuses dans les cellules considérées comme matures.

Après coloration au sulfate de berbérine, on observe au microscope à fluorescence des granulations colorées dans le cytoplasme des mastocytes, correspondant aux
25 granules contenant de l'héparine. La quantité d'héparine apparaît variable d'une cellule à l'autre ; cette variation peut être en relation avec le stade de maturation des cellules.

Après coloration au bleu alcian-safranine, les
30 grains d'héparine sont colorés en rouge par la safranine et les grains d'histamine en bleu par le bleu alcian. On observe dans certaines cellules un fort marquage de l'héparine, comme dans le cas de la coloration par la berbérine.

La caractérisation morphologique a été complétée
35 par une observation en microscopie électronique.

Les mastocytes de porc observés sont des cellules de grande taille (16 μ m). Ils ont un gros noyau clair, souvent excentré, à contour régulier, avec une chromatine légèrement marginée. Dans le noyau, on observe un à deux
5 nucléoles volumineux en position centrale. Le cytoplasme est assez abondant, il contient des ribosomes, de nombreuses mitochondries volumineuses, et de nombreuses granulations.

Les granulations apparaissent entourées d'une membrane simple, contenant un matériel plus ou moins dense
10 aux électrons, d'aspect irrégulier avec des particules petites ou moyennes, parfois des structures en forme de bâtonnets plus ou moins réguliers. Ces granulations sont du même type que celles décrites dans des mastocytes humains en culture (EGUCHI, Electron. Microsc. Rev., 4(2), 293-318,
15 1991).

Mise en évidence du récepteur c-kit et du récepteur des IgE

La présence de ces récepteurs a été mise en évidence par immunohistochimie.

Récepteur c-kit

20 Ce récepteur a été détecté en utilisant l'anticorps polyclonal C19 de lapin anti c-Kit humain (TEBU), qui reconnaît également le récepteur c-kit porcin.

Des marquages indirects à différents temps de culture ont été réalisés sur lames après cytocentrifugation
25 des cellules. Deux anticorps polyclonaux ont été utilisés : 1er) l'anticorps C19, 2ème) l'anticorps de chèvre anti lapin FITC (fluorescéine) (TEBU). Des cellules HMCI (provenant d'un mastocytome humain) ont été utilisées comme témoin positif.

- Après cytocentrifugation les cellules sont
30 fixées avec du méthanol pendant 5 mn.

- Elles sont ensuite séchées à l'air et rincées à 2 reprises en PBS+BSA 1% pendant 5 mn.

- Incubées ensuite avec du sérum de chèvre à 5% pendant 20 mn à température ambiante en chambre humide.

35 - 2 rinçages de 5 mn en PBS+BSA 1%.

- Incubées avec le 1^{er} anticorps (C 19 au 1/50^{ème}) 1h30mn à 37°C en chambre humide.
 - 2 rinçages en PBS+BSA 1% (2 x 5 mn).
 - Incubées avec le 2^{ème} anticorps (chèvre anti-lapin FITC au 1/200^{ème}) 1 h 30mn à 37°C en chambre humide.
 - 2 rinçages de 5 mn en PBS.
 - Les lames sont montées en mowiol.
- La lecture est effectuée au microscope à fluorescence.
- On observe un marquage positif membranaire sur la quasi-totalité des cellules ; ce marquage est identique à celui observé sur les cellules témoins HMCI, ce qui montre que les cellules analysées possèdent des récepteurs c-kit.
- Récepteur des IgE*
- Des marquages directs à différents temps de la culture ont été réalisés en cytométrie de flux sur les mastocytes en culture avec un anticorps anti IgE de souris FITC. On a utilisé comme témoin positif des cellules RBL (lignée de basophiles de rat transformés en mastocytes).
- On utilise 1 ml de cellules en culture à environ 10⁶ cellules/ml pour chaque tube.
 - Les cellules sont centrifugées pour éliminer le milieu de culture.
 - Les culots sont repris dans 1 ml de PBS+BSA 1%, et incubés pendant 30 mn à +4°C.
 - Les tubes sont centrifugés et les culots sont repris dans 100µl d'anticorps anti IgE souris FITC dilué au 4/100^{ème}, incubés 1h30 mn à +4°C.
 - On effectue un rinçage dans 2 ml de PBS, puis les tubes sont centrifugés.
 - Les culots sont recueillis dans 1 ml de PBS.
- La lecture est faite en FACS.
- A partir de J60 pour les cultures issues de la moelle osseuse, et de J67 pour les cultures issues du foie, 99% des cellules sont marquées ; le marquage est identique

sur les cellules témoins RBL. Il apparaît donc que les cellules analysées possèdent le récepteur à l'IgE.

A J639, les profils de FACS montrent, pour les mastocytes du foie, deux populations cellulaires ; une population qui exprime faiblement les récepteurs aux IgE (17,5%) et une population qui exprime fortement les récepteurs aux IgE 82,5%.

Analyse de l'ADN génomique des cellules

20 microsatellites du panel diversifié du génome de porc ont été analysés à partir de l'ADN des cellules en culture (prélevé 489 jours après la mise en culture) et de celui du verrat et de la truie parents des 7 fœtus sur lesquels ont été prélevés le foie et la moelle osseuse. Les marqueurs choisis sont très polymorphes et répartis sur la quasi-totalité des chromosomes.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- La vérification mendélienne est satisfaisante, les cellules proviennent bien de fœtus dont les parents étaient identifiés ;
- Pour 4 marqueurs principaux identifiés, IGFI, S0026, S0226 et SW240, les tailles observées correspondent aux allèles majoritaires ;
- Quel que soit le marqueur, les génotypes des différents échantillons d'ADN des cultures de mastocytes de foie fœtal, et de moelle fœtale sont identiques.

L'ADN génomique des cellules n'a pas été modifié pendant la culture (au moins pendant 489 jours, date de la préparation des échantillons d'ADN).

Isolement de populations pures de mastocytes a partir de moelle ou de foie de fœtus de porc de race Large White

Les prélèvements ont été réalisés à partir de 5 fœtus d'une truie Large White au 77^{ème} jour de gestation ; 7 foies et 8 fémurs ont été prélevés.

Les cellules ont été isolées et mises en culture, à partir du foie ou de la moelle, comme décrit ci-dessus pour les cellules fœtales de race Meishan.

Des cultures pures de mastocytes de moelle osseuse ou de mastocytes de foie ont été obtenues après 112 jours de culture.

EXEMPLE 2 : OBTENTION DE LIGNEES DE MASTOCYTES DE PORC
5 TRANSFECTEES PAR UN ONCOGENE.

Immortalisation des cellules en culture

Un prélèvement de 2.10^5 mastocytes de foie fœtal à 202 jours de culture est transfecté par lipofection en utilisant le vecteur pLM13, préalablement linéarisé par
10 l'enzyme de restriction ScaI associé à un liposome artificiel, FuGENE6 (BOEHRINGER-MANNHEIM). Le vecteur pLM13 comprend les séquences codant pour un mutant thermosensible de l'oncogène T (Tts) du virus simien vacuolisant SV40, et celles codant pour le gène néo (résistance à la généticine).
15 Ces séquences sont sous le contrôle d'un promoteur de cytomégalo virus.

La présence de l'oncogène Tts dans l'ADN génomique des cellules transfectées a été observée par PCR. L'expression de Tts a été révélée par RT-PCR à partir d'une
20 préparation d'ARN messagers des mêmes cellules.

Croissance des mastocytes transfectés

Une courbe de croissance a été réalisée sur les cellules non transfectées et sur les cellules transfectées de J470 à J511, soit pendant 41 jours de culture. A partir d'une
25 concentration initiale de 5.10^5 cellules/ml, les cellules ont été comptées tous les jours et rapportées à cette concentration initiale, pour évaluer le nombre de divisions. Les résultats sont illustrés par la Figure 1. En abscisse, le temps de culture (en jours) ; en ordonnée le nombre de
30 divisions.

On observe une différence de croissance entre les mastocytes de foie non transfectés (\square) et transfectés (Δ). Le temps de division pour les mastocytes non transfectés est en moyenne de 6 jours, alors qu'il est de 5 jours pour les
35 mastocytes des foies transfectés (Figure 1).

Caractérisation des lignées obtenues

Les cultures de mastocytes transfectés présentent, au niveau de leur morphologie et de la présence d'héparine, les mêmes caractéristiques que les cultures de mastocytes non-transfectés.

Elles possèdent également les mêmes caractéristiques du récepteur c-kit. Toutefois, en ce qui concerne le récepteur des IgE, au lieu des deux populations cellulaires observées à J639 dans le cas des cultures de mastocytes de foie non transfectés, on observe une seule population.

EXEMPLE 3 : PRODUCTION D'HISTAMINE PAR LES MASTOCYTES EN CULTURE.

Dosages d'histamine dans les mastocytes :

Des dosages d'histamine ont été réalisées sur les trois lignées cellulaires CNCM I-2735 (foie), CNCM I-2736 (foie transfecté par l'oncogène Tts de SV40) et CNCM I-2734 (moelle osseuse transfectée par l'oncogène Tts de SV40) à 976 jours de culture. Les cellules sont placées dans du milieu MEM α complet sans sérum.

1) Préparation des cellules :

50000 cellules de chaque lignée ont été activées pendant 30 minutes à 37°C en présence de 5% de CO₂, par 500 μ M d'ionophore calcique A23187 et 5 μ M de PMA (phorbol myristate acétate). Le même nombre de cellules de chaque lignée a été placé à 37°C pour servir de contrôle non-activé.

Les cellules sont ensuite centrifugées et les surnageants ainsi que les culots sont récupérés et congelés à -80°C jusqu'au moment du dosage de l'histamine.

2) Dosage de l'histamine :

Le dosage de l'histamine a été réalisé dans les surnageants et les culots selon la technique décrite par LEBEL (Ann. Biochem. 133, 16-29, 1983).

Les résultats sont illustrés par le Tableau II ci-dessous.

TABLEAU II

LIGNEE/TRAITEMENT	HISTAMINE DANS SURNAGEANT (ng/ml)	HISTAMINE DANS CULOT CELLULAIRE (ng/10 ⁶ cellules)	LIBERATION D'HISTAMINE (%)
I-2735 non activée	14	1583	48
I-2735 activée	449	466	
I-2734 non activée	16	1460	28
I-2734 activée	250	600	
I-2736 non activée	23	4380	25
I-2736 activée	593	1760	

Toutes les cellules contiennent de l'histamine.
La concentration d'histamine dans les surnageants est plus
importante dans les cellules activées que dans les cellules
5 non activées.

Le pourcentage de libération d'histamine par les cellules
activées est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de libération} = \frac{S - S \text{ Contrôle} \times 100}{(S+P) - S \text{ Contrôle}}$$

10

dans laquelle :

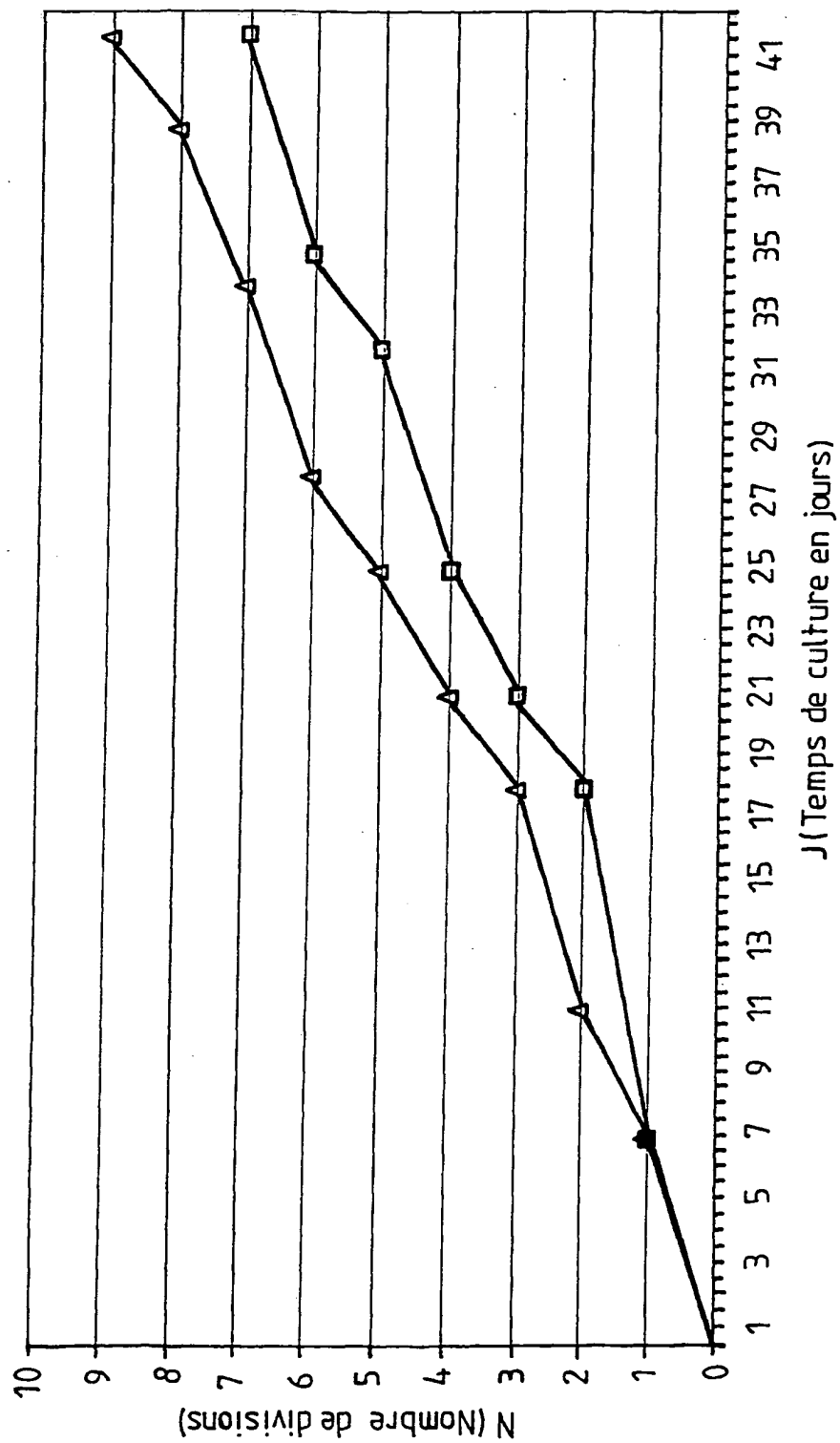
S= Histamine dans le surnageant

C= histamine dans le culot.

REVENDEICATIONS

- 1) Procédé d'obtention d'une culture de mastocytes porcins, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture de cellules souches obtenues à partir du foie ou de la moelle osseuse d'un fœtus de porc, dans un milieu comprenant au moins 0,2 ng/ml d'IL-3 porcin et au moins 8 ng/ml de SCF porcin.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdites cellules sont maintenues en culture dans ledit milieu pendant au moins 60 à 70 jours.
- 3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend en outre la transformation de cellules de ladite culture par un oncogène immortalisant.
- 4) Culture de mastocytes porcins susceptible d'être obtenue par un procédé selon une quelconque des revendications 1 à 3.
- 5) Culture de mastocytes porcins selon la revendication 4, choisie parmi :
- la lignée déposée auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2735 ;
 - la lignée déposée auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2736 ;
 - la lignée déposée auprès de la CNCM le 17 octobre 2001, sous le numéro I-2734.
- 6) Utilisation d'une culture de mastocytes porcins selon une quelconque des revendications 4 ou 5 en tant que modèle d'étude de l'activation mastocytaire.
- 7) Utilisation d'une culture de mastocytes porcins selon une quelconque des revendications 4 ou 5, pour le criblage *in vitro* d'antigènes capables d'induire l'activation des mastocytes.

1 / 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR02/03616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N5/06 C12N5/10 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>EMERY DAVID W ET AL: "Enhancement of swine progenitor chimerism in mixed swine/human bone marrow cultures with swine cytokines." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE), vol. 27, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 1330-1337, XP002228914 ISSN: 0301-472X abstract page 1331, left-hand column, last paragraph page 1332, left-hand column, paragraph 1 -right-hand column, paragraph 2 --- -/--</p>	1,6,7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2003

Date of mailing of the international search report

14/02/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 92/03616

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ISHIZAKA TERUKO ET AL: "Development of human mast cells from their progenitors." CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 5, no. 6, 1993, pages 937-943, XP008005659 ISSN: 0952-7915 cited in the application page 937, right-hand column, paragraph 3 -page 938, right-hand column, paragraph 1 page 940, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 1</p>	1,6,7
A	<p>EMERY DAVID W ET AL: "Culture and characterization of hematopoietic progenitor cells from miniature swine." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE), vol. 24, no. 8, 1996, pages 927-935, XP008006037 ISSN: 0301-472X abstract page 927, right-hand column, last paragraph -page 928, left-hand column, paragraph 1 page 931, left-hand column, paragraph 3; table 1 page 932, right-hand column, paragraph 2 -page 933, left-hand column, paragraph 1</p>	1,6,7
A	<p>RAZIN E ET AL: "CULTURE FROM MOUSE BONE MARROW OF A SUBCLASS OF MAST CELLS POSSESSING A DISTINCT CHONDROITIN SULFATE PROTEO GLYCAN WITH GLYCOSAMINO GLYCANS RICH IN N ACETYL GALACTOSAMINE 4 6 DI SULFATE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 257, no. 12, 1982, pages 7229-7236, XP008005645 ISSN: 0021-9258 cited in the application page 7229, left-hand column, paragraph 1 -page 7230, left-hand column, paragraph 1</p>	1,6,7
A	<p>ZHANG Z ET AL: "PORCINE STEM CELL FACTOR/C-KIT LIGANDS: ITS MOLECULAR CLONING AND LOCALIZATION WITHIN THE UTERUS" BIOLOGY OF REPRODUCTION, SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, CHAMPAIGN, IL, US, vol. 50, no. 1, 1994, pages 95-102, XP000609781 ISSN: 0006-3363 abstract page 101, left-hand column, last paragraph -right-hand column, last paragraph</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No
PCT/FR 02/03616

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>ISHIZAKA TERUKO ET AL: "Development of human mast cells from their progenitors." CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 5, no. 6, 1993, pages 937-943, XP008005659 ISSN: 0952-7915 cité dans la demande page 937, colonne de droite, alinéa 3 -page 938, colonne de droite, alinéa 1 page 940, colonne de gauche, alinéa 2 -colonne de droite, alinéa 1</p>	1,6,7
A	<p>EMERY DAVID W ET AL: "Culture and characterization of hematopoietic progenitor cells from miniature swine." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE), vol. 24, no. 8, 1996, pages 927-935, XP008006037 ISSN: 0301-472X abrégé page 927, colonne de droite, dernier alinéa -page 928, colonne de gauche, alinéa 1 page 931, colonne de gauche, alinéa 3; tableau 1 page 932, colonne de droite, alinéa 2 -page 933, colonne de gauche, alinéa 1</p>	1,6,7
A	<p>RAZIN E ET AL: "CULTURE FROM MOUSE BONE MARROW OF A SUBCLASS OF MAST CELLS POSSESSING A DISTINCT CHONDROITIN SULFATE PROTEO GLYCAN WITH GLYCOSAMINO GLYCANS RICH IN N ACETYL GALACTOSAMINE 4 6 DI SULFATE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 257, no. 12, 1982, pages 7229-7236, XP008005645 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande page 7229, colonne de gauche, alinéa 1 -page 7230, colonne de gauche, alinéa 1</p>	1,6,7
A	<p>ZHANG Z ET AL: "PORCINE STEM CELL FACTOR/C-KIT LIGANDS: ITS MOLECULAR CLONING AND LOCALIZATION WITHIN THE UTERUS" BIOLOGY OF REPRODUCTION, SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, CHAMPAIGN, IL, US, vol. 50, no. 1, 1994, pages 95-102, XP000609781 ISSN: 0006-3363 abrégé page 101, colonne de gauche, dernier alinéa -colonne de droite, dernier alinéa</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR-02/03616

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N5/06 C12N5/10 C12Q1/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>EMERY DAVID W ET AL: "Enhancement of swine progenitor chimerism in mixed swine/human bone marrow cultures with swine cytokines." EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE), vol. 27, no. 8, août 1999 (1999-08), pages 1330-1337, XP002228914 ISSN: 0301-472X abrégé page 1331, colonne de gauche, dernier alinéa page 1332, colonne de gauche, alinéa 1 -colonne de droite, alinéa 2</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1,6,7

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 janvier 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/02/2003

Nom et adresse postale de l'administration
Office Européen des Brevets
NL - 2280 HW Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax (+31-70) 340-3016

Applicant: GUILLAUME, et al.

Filing Date: 4/13/2004

Application No.: 10/823,142

Docket No.: FRAV2003/0009 US NP

e11, A.M.